

В. К. АНТОНОВ, Т. И. ВОРОТЫНЦЕВА

СВЯЗЫВАНИЕ СУБСТРАТА МЕТИЛИРОВАННЫМ ПО ГИСТИДИНУ-57 ПРОИЗВОДНЫМ α -ХИМОТРИПСИНА

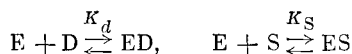
(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 30 IV 1971)

При изучении локальной и общей конформационной устойчивости α -химотрипсина в процессе денатурации (см. ⁽¹⁾) мы встретились с необходимостью располагать производным этого фермента, лишенным каталитических свойств, но сохранившим способность сорбировать субстраты. В поисках такого производного мы обратились к описанному Накагава и Бендером ^(2, 3) препарату, полученному метилированием α -химотрипсина метиловым эфиром *p*-нитробензолсульфокислоты (МНБС). Из анализа модели химотрипсина, построенной на основе кристаллографических данных ⁽⁴⁾, можно было ожидать, что метилирование N⁶-атома остатка гистидина-57 не должно препятствовать связыванию субстратов. Действительно, мы обнаружили, что метилирование химотрипсина МНБС, лишая его каталитических свойств, не влияет на связывающие субстрат свойства.

Кристаллический α -химотрипсин Олайнского завода медпрепаратов, содержащий 0,95 мг активного фермента на 1 мг белка, метилировали в условиях, описанных в работе ⁽³⁾. Модифицированный фермент выделяли гель-фильтрацией на сефадексе Г-25 (тонкий), используя колонку размером 60 × 3 см (на 500 мг исходного фермента), элюируя водой и собирая зону в 100 мл, выходящую с фронтом элюента.

Выход метил-производного химотрипсина после лиофилизации составил 70%. Определение концентрации активных центров по транс-циннамоил-имидазолу показало отсутствие активности, а число оборотов по гидролизу этилового эфира N-ацетил-L-тирозина соответствовало остаточной активности 0,12%. Оказалось, что модифицированный метилированием химотрипсин эффективно связывает акридиновый краситель профлавин. Константа связывания, определенная спектрофотометрическим титрованием ⁽⁵⁾, оказалась равной $1,38 \cdot 10^{-5} M$ (фосфатный буфер 0,1N; pH 7,6), что несколько ниже найденной нами константы ($2,4 \cdot 10^{-5} M$) связывающая профлавина нативным химотрипсином.

Для определения константы связывания субстрата химотрипсина — этилового эфира N-ацетил-L-тирозина мы использовали метод вытеснения профлавина из его комплекса с метилированным производным фермента. Согласно ⁽⁶⁾, для системы равновесий фермента (E) с красителем (D) и субстратом (S):



справедливо равенство

$$\frac{1}{[E]_0 - [ED]} = \frac{1}{K_{d(\text{каж})}} \frac{[D]_0}{[ED]} - \frac{1}{K_{d(\text{каж})}}, \quad \text{где} \quad K_{d(\text{каж})} = K_d \left(1 + \frac{[S]}{K_s} \right).$$

Значения $K_{d(\text{каж})}$, т. е. кажущуюся величину константы связывания профлавина при данной концентрации субстрата, можно найти, строя графики зависимости $1/([E]_0 - [ED])$ от $[D]_0/[ED]$ для разных концентраций субстрата. Далее, откладывая величины $K_{d(\text{каж})}$ от концентрации субстрата ($[S]$), можно определить величину K_s .

Полученные нами экспериментальные данные представлены на рис. 1 и 2. Как видно (рис. 1), семейство прямых пересекает ось абсцисс в точке $[D]_0/[ED] = 1$, откуда следует, что профлавин и субстрат конкурируют за один и тот же связывающий центр метилированного производного химотрипсина. Найденное нами (рис. 2) значение K_s оказалось равным $2,4 \cdot 10^{-3} M$ (0,1 N фосфатный буфер, pH 8,0, 20°C). Значение субстратной

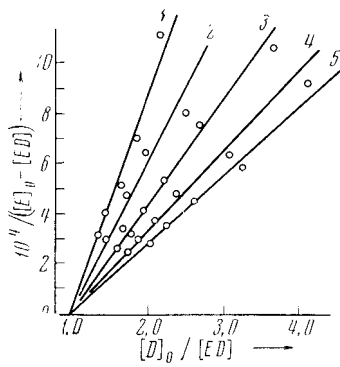


Рис. 1

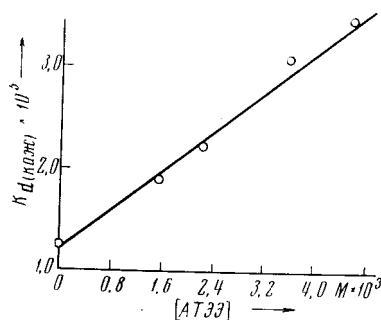


Рис. 2

Рис. 1. Определение величины $K_{d(наж)}$ методом вытеснения профлавина из его комплекса с метилпроизводным α -химотрипсина — этиловым эфиром N-ацетил-L-тирозина (АТЭЭ). $[E]_0 = 2,34 \cdot 10^{-5} - 7,01 \cdot 10^{-5}$ мол/л; $[D]_0 = 5,21 \cdot 10^{-5}$ мол/л; $[S]_0$: 1 — 0, 2 — $1,5 \cdot 10^{-3}$, 3 — $2,2 \cdot 10^{-3}$, 4 — $3,5 \cdot 10^{-3}$, 5 — $4,5 \cdot 10^{-3}$ мол/л, 0,1 M фосфатный буфер, pH 8,0

Рис. 2. Определение величины K_s взаимодействия этилового эфира N-ацетил-L-тирозина и метилированного по гистидину-57 производного α -химотрипсина

константы K_s этилового эфира N-ацетил-L-тирозина в отношении нативного химотрипсина составляет (⁷) $14,2 \cdot 10^{-3} M$. Таким образом, связывающая способность метилированного по гистидину-57 производного химотрипсина даже несколько выше, чем нативного фермента. Возможно, что это обусловлено увеличением гидрофобности активного центра фермента за счет метилирования.

Полученные нами данные свидетельствуют о независимости сорбционных и каталитических свойств химотрипсина. Разрушение системы переноса заряда (⁸) не сказывается на способности фермента связывать субстрат. Отсутствие каталитических свойств при полном сохранении связывающей способности метилированного α -химотрипсина открывает возможность изучения механизма сорбции субстратов этим ферментом, не осложненного последующей стадией превращения субстрата*.

Институт химии природных соединений
им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР
Москва

Поступило
23 IV 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. К. Антонов, Т. И. Воротынцева, Г. А. Коган, Молек. биол., 4, 240 (1970). ² Y. Nakagawa, M. L. Bender, J. Am. Chem. Soc., 91, 1566 (1969). ³ Y. Nakagawa, M. L. Bender, Biochemistry, 9, 259 (1970). ⁴ J. J. Birktoft, B. W. Matthews, D. M. Blow, Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 131 (1969). ⁵ A. N. Glaser, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 54, 171 (1965). ⁶ И. В. Березин, А. В. Левашов, К. Мартинек, ДАН, 177, 221 (1967). ⁷ B. Zerner, M. L. Bender, J. Am. Chem. Soc., 86, 3669 (1964). ⁸ D. M. Blow, J. J. Birktoft, B. S. Hartley, Nature, 221, 337 (1969). ⁹ R. Henderson, Biochem. J., 124, 13 (1971).

* *Примечание при корректуре.* Когда эта статья находилась в печати, появились аналогичные данные Гендерсона (⁹).